

## TITLE OF THE INVENTION

### METHOD OF ANALYZING PROKARYOTIC GENE EXPRESSION

## FIELD OF THE INVENTION

本発明は、遺伝子発現解析の方法に関し、特に、原核生物についての遺伝子発現解析の方法に関する。

## BACKGROUND OF THE INVENTION

従来の真核生物についての遺伝子発現の解析方法は、例えば、国際公開WO 02 / 48352 A1 に開示されている。この方法では、真核生物の細胞から mRNA が抽出され、mRNA から cDNA が合成される。そして、cDNA が加工され、遺伝子発現解析に利用される。

しかしながら、原核生物の遺伝子発現解析をする場合、原核生物のmRNA は、ポリ A 配列を持たないため、従来の方法では、遺伝子発現解析を行うことができなかった。

## SUMMARY OF THE INVENTION

本発明は、原核生物について容易に遺伝子発現解析をすることができる原核生物の遺伝子発現解析方法を提供することを目的とする。

上記目的を達成するため、本発明は、原核生物の細胞からmRNA を抽出するmRNA 抽出工程と、上記mRNA の3' 末端にポリ A を付加するポリ A 付加工程と、上記ポリ A が付加されたmRNAからcDNA を合成するcDNA 合成工程と、上記cDNA から一端に第 1 アダプター配列を有し他端に第 2 アダプター配列を有するアダプター付きcDNA 断片を作成するcDNA加工工程と、上記アダプター付きcDNA 断片について、上記第 1 アダプター配列に相補的な配列を有する第 1 プライマーと、上記第 2 アダプター配列に相補的な配列を有する第 2 プライマーとを用いて、PCR 反応を行う第 1 PCR 工程と、上記第 1 PCR 工程で増幅されたcDNA 断片について電気泳動を行う電気泳動工程と、上記電気泳動の結果に基づいて、目的のcDNA 断片を回収するcDNA 断片回収工程と、を備える原核生物の遺伝子発現解析方法を提供する。

本発明によれば、まず、原核生物の細胞からmRNA が抽出される。その後、抽出

したmRNAの3'末端にポリA テイルが付加される。そして、このポリA テイルを利用して、mRNAからcDNAが合成される。次に、cDNA加工工程において、cDNAから一端に第1アダプター配列を有し他端に第2アダプター配列を有するアダプター付きcDNA断片が作成される。その後、このアダプター付きcDNA断片に対して、第1アダプター配列に相補的な配列を有する第1プライマーと、第2アダプター配列に相補的な配列を有する第2プライマーとを用いて、PCR反応が行なわれる。次に、PCRで増幅されたcDNA断片について電気泳動が行なわれる。そして、この電気泳動の結果に基づいて、目的のcDNA断片が回収され、遺伝子発現解析に利用される。

このような方法では、細胞から抽出したmRNAにポリAが付加されるので、これを利用することで容易にcDNAを合成することができる。従って、原核生物であっても、その遺伝子発現解析を容易に行なうことができる。

さらに、cDNAから両端にアダプター配列を持つcDNA断片を作成し、これらのアダプター配列に相補的な配列を有するプライマーセットを用いてPCR反応を行うので、cDNA断片を多量に増幅することができる。従って、cDNA断片の群の中に存在する目的のcDNA断片が低濃度であっても、それを大幅に増幅することができ、電気泳動においてそれを容易に検出することができる。また、後述するように、第1、第2プライマーを適宜選択することにより、両端にアダプター配列を持つcDNA断片群の中から、一部のcDNA断片だけを選択的に増幅することができるため、遺伝子発現解析をより容易に行なうことができる。

ここで、アダプター付きcDNA断片は、一端に第1アダプター配列を有し他端に第2アダプター配列を有するものであれば、いかなるものであってよい。即ち、このcDNA断片の群は、抽出に用いた細胞で発現されたほとんどすべての遺伝子が含まれる群であっても、その発現された遺伝子の一部だけが含まれる群であってもよい。また、このcDNA断片は、全長cDNAの両端にアダプター配列が付いたものでも、全長cDNAの一部分をなす断片の両端にアダプター配列が付いたものでもよい。また、第1アダプター配列及び第2アダプター配列は、それぞれいかなる塩基配列からなるものであっても構わないが、後に行なうPCRの効率等を考慮して設計されたものであるのが好ましい。即ち、これらのアダプター配列がそれ

それ15塩基前後であると、安定したPCR反応を行うことができ、効率よくcDNA断片を増幅することができる。

第1プライマーは、第1アダプター配列に相補的な配列を有するものであれば、いかなるものであってもよい。ここでいう相補的な配列とは、第1アダプターに対し100%相補的な配列に限られず、PCR反応においてcDNA断片を増幅できる程度に実質的に相補的な配列も含まれる。また、第1プライマーは、第1アダプター配列に相補的な配列のみからなるものに限られず、第1アダプター配列に相補的な配列に、さらに他の配列が繋がったものであってもよい。また、第1プライマーは、第1アダプター配列全体に対応するものに限られず、第1アダプター配列の一部に対応するものでもよい。

同様に、第2プライマーは、第2アダプター配列に相補的な配列を有するものであれば、いかなるものであってもよい。ここでいう相補的な配列も、第2アダプターに対し100%相補的な配列に限られず、PCR反応においてcDNA断片を増幅できる程度に実質的に相補的な配列も含まれる。また、第2プライマーも、第2アダプター配列に相補的な配列のみからなるものに限られず、第2アダプター配列に相補的な配列に、さらに他の配列が繋がったものであってもよい。また、第2プライマーは、第2アダプター配列全体に対応するものに限られず、第2アダプター配列の一部に対応するものでもよい。

なお、これらのプライマーとして、それぞれ、その3'末端に任意の2塩基配列であるNNを有するものを利用することができる。ここで使用される「任意の2塩基配列であるNN」は、A、T、G、Cから任意に選択される配列である。ここで、各任意の配列を2塩基としたのは、当該方法の簡便性と解析精度を考慮した結果である。つまり、各任意の配列を2塩基とすることにより、256種類のプライマーセットが得られるため、cDNA断片の群を256種類の群に分類することができる。その結果、1つの群には、解析が容易な比較的少ない種類のcDNA断片が含まれるようになる。なお、この任意の2塩基配列NNを、一方のプライマーまたは両方のプライマーについて3塩基以上とすることも可能である。それによってプライマーの種類が増え、プライマーセットを1024種類や4096種類とすることができる。

次に、その他一般にPCR反応で用いられる種々の試薬について説明する。

DNA ポリメラーゼは、PCR 反応においてDNA 鎮を変性させる際の高温に短時間加熱されても永久的には不活性化されず、しかも、高温における活性を有するものが好適である。例えば、サーモコッカス・リトラリス(*Thermococcus litoralis*)、バチルス・ステアロサーモフィルス (*Bacillus stearothermophilus*)、メタノサーマス・フェルビドゥス (*Methanothermus fervidus*)、サーマス・アクアティクス (*Thermus aquaticus*)、T. フラブス (*T. flavus*)、T. ラクテウス (*T. lacteus*)、T. ルベンス (*T. rubens*)、T. ルバー (*T. ruber*) などの高熱菌由来のDNA ポリメラーゼや、デスルフロコッカス・モビリス (*Desulfurococcus mobilis*)、メタノバクテリウム・サーモオートトロフィルクム (*Methanobacterium thermoautotrophicum*)、スルホロブス・ソルファタリクス (*Sulfolobus solfatarius*)、S. アシドカルダリウス (*S. acidocaldarius*)、サーモプラスマ・アシドフィルム (*Thermoplasma acidophilum*)、ピロコッカス・コダカラエンシス (*Pyrococcus kodakaraensis* KOD1 株) などの高熱性古細菌由来のDNA ポリメラーゼなどが挙げられる。これらのうち、入手容易性等の理由から、サーマス・アクアティクス (*Thermus aquaticus*) 由来のDNA ポリメラーゼ (Taq DNA ポリメラーゼ)、サーモコッカス・リトラリス (*Thermococcus litoralis*) 由来のDNA ポリメラーゼ、あるいは、ピロコッカス・コダカラエンシス (*Pyrococcus kodakaraensis* KOD1 株) 由来のDNA ポリメラーゼを利用するのが好ましい。

さらに、PCR 反応液には、DNA ポリメラーゼによる核酸増幅前の活性を阻害するため、DNA ポリメラーゼに特異的な抗体を混合してもよい。この抗体には、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、組換え法により製造された抗体、化学的または組換え法により製造された抗体フラグメント（例えば、Fab フラグメント）が挙げられる。これらのうち、モノクローナル抗体を用いるのが特に好ましい。例えば、Taq DNA ポリメラーゼに対する公知のモノクローナル抗体は、約 20℃～40℃においてTaq DNA ポリメラーゼの酵素活性を阻害することができると共に、PCR の熱的サイクルにおける高温によって不活性化される。

また、PCR 反応は、一般に、4 種類のdNTP、即ち、dATP、dCTP、dGTP 及び dTTP の存在化において行う。

さらに、PCR 反応は、一般に、適当な緩衝剤を含む反応液中で行われる。効率

よく核酸を増幅させるためである。緩衝液は、使用するDNA ポリメラーゼ等により、反応の最適条件を得るために適宜変更することができる。例えば、pH を適当に調整したトリス系の緩衝液に、塩化カリウムや塩化マグネシウムを加えた緩衝液を利用することができる。また、PCR 反応液には、5 %～10 %のDMSO と1 %～2 % のベタインを添加してもよい。錫型DNA となるcDNA 断片が二字構造を有する場合に産物が増幅されにくいという問題を、最小限に留める効果を有するものである。

電気泳動工程では、アクリルアミドゲル電気泳動やアガロースゲル電気泳動など、公知の平板ゲル電気泳動などにより、cDNA 断片（PCR 産物）を電気泳動し、cDNA 断片を分画することができる。また、キャピラリーカラムを用いた電気泳動を利用することもできる。これらの電気泳動には、公知の電気泳動装置を利用すればよい。

cDNA 断片回収工程は、電気泳動の結果に基づいて目的とするcDNA 断片を回収する工程であれば、いかなる方法を利用することもできる。

例えば、標識物質を検出することができるDNA シークエンサーにcDNA 断片を供試して電気泳動工程を行い、その解析結果から、回収するcDNA 断片を決定する。次に、再度同一サンプルを電気泳動して、目的とするcDNA 断片が検出されたときに、その部分のゲルを切り出し、そこから当該cDNA 断片を回収する方法が挙げられる。

また、ゲル電気泳動後、標識物質を検出することができるスキャナー上にゲルを載置し、その解析結果から回収するcDNA 断片を決定する。そして、その部分のゲルを切り出し、そこから当該cDNA 断片を回収する方法が挙げられる。

さらに、上記の原核生物の遺伝子発現解析方法であって、前記mRNA 抽出工程は、前記原核生物の細胞から全RNA を抽出する工程と、16S rRNA の一部に相補的な配列を有する第1 ヌクレオチドを上記16S rRNA にハイブリダイズさせると共に、23S rRNA の一部に相補的な配列を有する第2 ヌクレオチドを23S rRNA にハイブリダイズさせる工程と、上記第1 ヌクレオチドのうち、上記16S rRNA に相補的な部位とは別の部位に対し相補的である配列を有する第3 ヌクレオチドが付加された第1 タグ物質を、上記16S rRNA と上記第1 ヌクレオチドの結合物にハイブリダイズさせると共に、上記第2 ヌクレオチドのうち、上記23S rRNA に相補

的な部位とは別の部位に対し相補的である配列を有する第4 ヌクレオチドが付加された第2 タグ物質を、上記23S rRNA と上記第2 ヌクレオチドの結合物にハイブリダイズさせる工程と、上記全RNA から、上記16S rRNA と上記第1 ヌクレオチドと上記第3 ヌクレオチドが付加された上記第1 タグ物質との結合物を除去すると共に、上記23S rRNA と上記第2 ヌクレオチドと上記第4 ヌクレオチドが付加された上記第2 タグ物質との結合物を除去する工程と、を有すると良い。

原核生物においては、前述したようにmRNA にポリA テイルがないため、このポリA テイルを利用して抽出した全RNA からmRNA を精製する方法を探ることができない。

これに対し、本発明のmRNA 抽出工程では、まず、原核生物の細胞から全RNAを抽出する。そして、抽出した全RNA に対し、16S rRNA の一部に相補的な配列を有する第1 ヌクレオチドを16S rRNA にハイブリダイズさせると共に、23S rRNA の一部に相補的な配列を有する第2 ヌクレオチドを23S rRNA にハイブリダイズさせる。その後、第1 ヌクレオチドのうち、16S rRNA に相補的な部位とは別の部位に対し相補的な配列を有する第3 ヌクレオチドが付加された第1 タグ物質を、16S rRNA と第1 ヌクレオチドの結合物にハイブリダイズさせる。また、第2 ヌクレオチドのうち、23S rRNA に相補的な部位とは別の部位に対し相補的な配列を有する第4 ヌクレオチドが付加された第2 タグ物質を、23S rRNA と第2 ヌクレオチドの結合物にハイブリダイズさせる。その後、全RNA から、16S rRNA と第1 ヌクレオチドと第3 ヌクレオチドが付加された第1 タグ物質との結合物を除去すると共に、23S rRNA と第2 ヌクレオチドと第4 ヌクレオチドが付加された第2 タグ物質との結合物を除去する。

このような方法によれば、全RNA から、全RNA の中に多量に存在する16S rRNA と23S rRNA の大部分を除去することができる。従って、mRNA を容易により高純度に精製することができる。

ここで、第1 ヌクレオチドは、16S rRNA の一部に相補的な配列を有し、かつ、第3 ヌクレオチドに相補的な配列を有するものであれば、いかなるものであってもよい。従って、16S rRNA の一部に相補的な配列と第3 ヌクレオチドに相補的な配列以外の配列を有していても構わない。ここでいう16S rRNA の一部に相補的

な配列とは、16S rRNA の一部に対し100 %相補的な配列に限られず、適當な条件下で16S rRNA にハイブリダイズできる程度に実質的に相補的な配列も含まれる。また、第3 ヌクレオチド相補的な配列も、第3 ヌクレオチドに対し100 %相補的な配列に限られず、適當な条件下で第3 ヌクレオチドにハイブリダイズできる程度に実質的に相補的な配列も含まれる。また、第1 ヌクレオチドのうち、第3 ヌクレオチドに相補的な配列は、第3 ヌクレオチド全体に対応するものに限られず、第3 ヌクレオチドの一部に対応するものでもよい。

同様に、第2 ヌクレオチドは、23S rRNA の一部に相補的な配列を有し、かつ、第4 ヌクレオチドに相補的な配列を有するものであれば、いかなるものであってもよい。従って、23S rRNA の一部に相補的な配列と第4 ヌクレオチドに相補的な配列以外の配列を有していても構わない。ここでいう23S rRNA の一部に相補的な配列も、23S rRNA の一部に対し100 %相補的な配列に限られず、適當な条件下で23S rRNA にハイブリダイズできる程度に実質的に相補的な配列も含まれる。また、第4 ヌクレオチド相補的な配列も、第4 ヌクレオチドに対し100 %相補的な配列に限られず、適當な条件下で第4 ヌクレオチドにハイブリダイズできる程度に実質的に相補的な配列も含まれる。また、第2 ヌクレオチドのうち、第4 ヌクレオチドに相補的な配列は、第4 ヌクレオチド全体に対応するものに限られず、第4 ヌクレオチドの一部に対応するものでもよい。

一方、第3 ヌクレオチドは、第1 ヌクレオチドのうち、16S rRNA に相補的な部位とは別の部位に対し相補的な配列を有するものであれば、いかなるものであってもよい。従って、第1 ヌクレオチドの一部に相補的な配列以外の配列を有していても構わない。ここでいう第1 ヌクレオチドの一部に相補的な配列も、前述したように、第1 ヌクレオチドに対し100 %相補的な配列に限られず、適當な条件下で第1 ヌクレオチドにハイブリダイズできる程度に実質的に相補的な配列も含まれる。

同様に、第4 ヌクレオチドは、第2 ヌクレオチドのうち、23S rRNA に相補的な部位とは別の部位に対し相補的な配列を有するものであれば、いかなるものであってもよい。従って、第2 ヌクレオチドの一部に相補的な配列以外の配列を有していても構わない。ここでいう第2 ヌクレオチドの一部に相補的な配列も、前

述したように、第2ヌクレオチドに対し100%相補的な配列に限られず、適当な条件下で第2ヌクレオチドにハイブリダイズできる程度に実質的に相補的な配列も含まれる。

タグ物質は、その物質の性質を利用してることで、全RNAの中からタグ物質を含む結合物を除去できるものであれば、いずれの物質を利用することもできる。例えば、マグネットビーズが挙げられる。これをタグ物質に利用すれば、マグネットスタンド等を利用してマグネットビーズを沈降させることで、タグ物質を含む結合物のみを沈降させ、除去することができる。

さらに、上記の原核生物の遺伝子発現方法であって、前記第1ヌクレオチドと前記第2ヌクレオチドは、前記16S rRNAと前記23S rRNAが持つ共通配列に対し相補的である配列を有する同一のものであり、前記第3ヌクレオチドと前記第4ヌクレオチドも同一のものであり、前記第1タグ物質と前記第2タグ物質も同一のものであることを特徴とする原核生物の遺伝子発現方法とすると良い。

本発明によれば、第1ヌクレオチドと第2ヌクレオチドは、16S rRNAと23S rRNAが持つ共通配列に相補的な配列を有する同一の配列からなる。また、第3ヌクレオチドと第4ヌクレオチドも同一の配列からなる。さらに、第1タグ物質と第2タグ物質も同一物である。

従って、第1ヌクレオチドと第2ヌクレオチド、第3ヌクレオチドと第4ヌクレオチド、第1タグ物質と第2タグ物質は、それぞれ1種類で足りる。このため、16S rRNAと23S rRNAの除去がさらに容易にできる。

さらに、上記のいずれかに記載の原核生物の遺伝子発現解析方法であって、前記cDNA合成工程は、前記cDNAを合成すると共に上記cDNAの5'末端にタグ物質を付加し、前記cDNA加工工程は、上記cDNAを第1制限酵素で切断する第1切断工程と、上記タグ物質に高親和性を有する高親和性物質に結合させることにより、上記タグ物質を有するcDNA断片を回収する第1回収工程と、上記タグ物質を有するcDNA断片に、上記第1制限酵素の切断部位の配列に相補的な配列を有する第1アダプター配列を結合させる第1アダプター結合工程と、上記第1アダプター配列が結合されたcDNA断片を第2制限酵素で切断する第2切断工程と、上記高親和性物質に結合させることにより、上記タグ物質を有するcDNA断片を除去

し、上記タグ物質を有しないcDNA 断片を回収する第2 回収工程と、上記タグ物質を有しないcDNA 断片に、上記第2 制限酵素の切断部位の配列に相補的な配列を有する第2 アダプター配列を結合させる第2 アダプター結合工程と、を有すると良い。

本発明によれば、cDNA 合成工程において、cDNA を合成すると共にcDNA の5' 末端にタグ物質を付加しておく。そして、cDNA 加工工程において、まず、cDNA を第1 制限酵素で切断する。その後、タグ物質に高親和性を有する高親和性物質に結合させることにより、タグ物質を有するcDNA 断片を回収し、タグ物質を有しないcDNA 断片を除去する。即ち、cDNA の5' 末端側（PolyT 末端側）のcDNA 断片を回収し、3' 末端側のcDNA 断片を除去する。その後、この回収されたcDNA 断片に、第1 制限酵素の切断部位の配列に相補的な配列を有する第1 アダプター配列を結合させる。あるいは、cDNA を第1 制限酵素で切断した後、cDNA 断片に、第1 制限酵素の切断部位の配列に相補的な配列を有する第1 アダプター配列を結合させる。その後、タグ物質に高親和性を有する高親和性物質に結合させることにより、タグ物質を有するcDNA 断片を回収し、タグ物質を有しないcDNA 断片を除去する。

次に、第1 アダプター配列が結合されたcDNA 断片を第2 制限酵素で切断する。その後、高親和性物質に結合させることにより、今度は、タグ物質を有するcDNA 断片を除去し、タグ物質を有しないcDNA 断片を回収する。即ち、第1 アダプターが結合された側のcDNA 断片を回収し、第1 アダプターがない側のDNA 断片を除去する。その後、この回収されたcDNA 断片に、第2 制限酵素の切断部位の配列に相補的な配列を有する第2 アダプター配列を結合させる。

あるいは、cDNA 断片を第2 制限酵素で切断した後、cDNA 断片に、第2 制限酵素の切断部位の配列に相補的な配列を有する第2 アダプター配列を結合させる。その後、高親和性物質に結合させることにより、タグ物質を有するcDNA 断片を除去し、タグ物質を有しないcDNA 断片を回収する。

このようにすれば、一端に第1 アダプター配列を有し他端に第2 アダプター配列を有するアダプター付きcDNA 断片を容易に作成することができる。また、このようにして作成されたcDNA 断片の群は、細胞で発現されたほとんど全ての遺伝

子、即ち、公知の遺伝子も未知の遺伝子も同様に、その群の中に含まれるようにすることが可能である。従って、遺伝子発現解析において有効に活用することができる。

なお、本発明において、第1回収工程で利用する高親和性物質は、第1回収工程においてタグ物質に結合させてもよいが、例えば、第1切断工程前に予めタグ物質に結合させておいてもよい。

また、第2回収工程で利用する高親和性物質も、第2回収工程においてタグ物質に結合させてもよいが、例えば、第2切断工程前に予めタグ物質に接合させておいてもよい。

ここで、タグ物質と高親和性物質とは、互いに高親和性をもって特異的に結合することが可能な結合対を構成する物質であれば、いずれを利用することもできる。

また、制限酵素とは、一般的に、制限エンドヌクレアーゼとも称される酵素であり、特定の配列において二本鎖DNAを加水分解し切断する酵素である。上記の方法においては、適切な断片を得るために2種類の制限酵素（第1制限酵素及び第2制限酵素）を組み合わせて使用する。使用する制限酵素は、cDNA断片を識別可能な長さを有する断片に切断することが可能なものが好ましい。また、合成されたcDNA断片のより多くを、好ましくは、ほとんど全てを切断するような酵素が好ましい。また、制限酵素は、4塩基認識酵素を使用しても6塩基認識酵素を使用してもよいが、特に、上記の理由から、4塩基認識酵素の使用が好ましい。

また、アダプター配列は、PCR增幅の際に用いるプライマーを結合させるために用いるものであるが、使用する制限酵素に応じて設計される。即ち、第1制限酵素の酵素切断部位に結合させるための第1アダプター配列は、第1制限酵素の酵素切断部位に相補的な配列を有し、また、第2制限酵素の酵素切断部位に結合させるための第2アダプター配列は、第2制限酵素の酵素切断部位に相補的な配列を有する。

上記のいずれかに記載の原核生物の遺伝子発現解析方法であって、前記電気泳動工程は、ゲル電気泳動を行い、前記cDNA断片回収工程は、ゲルから目的の前

記cDNA 断片を含むゲルを切り出し、当該cDNA 断片を回収することを特徴とする原核生物の遺伝子発現解析方法とすると良い。

本発明によれば、電気泳動工程は、ゲル電気泳動を行う。また、cDNA 断片回収工程は、電気泳動を行ったゲルから目的のcDNA 断片を含むゲルを切り出し、そのcDNA 断片を回収する。

このようにcDNA 断片の群をゲル電気泳動によって分画すれば、例えばキャビラリーカラムによる電気泳動に比べ、サイズ分解能を向上させることができる。このため、目的とするcDNA 断片のみをより特異的に回収することができる。

さらに、上記のいずれかに記載の原核生物の遺伝子発現解析方法であって、前記第1 プライマー及び前記第2 プライマーの少なくともいずれかには、標識物質が付与されており、前記電気泳動において、上記標識物質が検出されると良い。本発明によれば、第1 プライマー及び第2 プライマーの少なくともいずれかには、標識物質が付与されている。そして、電気泳動において、この標識物質を検出する。

このように、標識物質を有するプライマーを用いてPCRを行えば、PCR 産物も標識物質を有することになる。従って、PCR 反応を行っても依然として目的とするcDNA 断片が比較的少ない場合であっても、電気泳動においてこの標識物質を認識することで、目的とするcDNA 断片のゲル中の位置を容易に検出することができる。

なお、標識物質は、電気泳動において検出感度が高いものであれば、いずれのものを使用することもできる。例えば、6-カルボキシフルオレッセイン（以下、FAM と称す。）、4,7,2',4',5',7'-ヘキサクロロ-6-カルボキシフルオレッセイン（以下、HEX と称す。）、NED（アプライドバイオシステムズジャパン社）、6-カルボキシ-X-ローダミン（以下、Rox と称す。）等の蛍光物質などを使用することができる。これらの標識物質は、例えば、プライマー-DNA の末端（例えば5'末端）に結合させればよい。

さらに、上記のいずれかに記載の原核生物の遺伝子発現解析方法であって、前記タグ物質と前記高親和性物質の組み合わせが、ビオチンとストレプトアビジン、ピアチンとアビジン、FITC とFITC 抗体、及び、DIG とアンチDIG

IG のいずれかであると良い。

前述したように、タグ物質と高親和性物質とは、互いに高親和性をもって特異的に結合することが可能な結合対を構成する物質であれば、いずれを利用するともできる。中でも、取り扱いの容易性や入手容易性などの理由から、本発明のように、タグ物質と高親和性物質の組合せとして、ビオチンとストレプトアビジン、ビオチンとアビジン、DIG とFITC 抗体、DIG とアンタイDIG を利用するのが特に好ましい。なお、各組合せにおいて、いずれをタグ物質として使用しても、いずれを高親和性物質として使用してもよい。

さらに、上記のいずれかに記載の原核生物の遺伝子発現解析方法であって、前記cDNA 断片回収工程後、回収した前記cDNA 断片をプラスミドベクターに連結し、組換え体プラスミドを形成する連結工程と、上記組換え体プラスミドを大腸菌に導入する導入工程と、を備えると良い。

本発明によれば、cDNA 断片回収工程後、回収したcDNA 断片をプラスミドベクターに連結し、組換え体プラスミドを形成する連結工程を備える。また、組換え体プラスミドを大腸菌に導入する導入工程を備える。

このように、回収した目的のcDNA 断片をプラスミドベクターに連結し、大腸菌に導入しておけば、cDNA 断片の構造解析をする場合などに有効である。即ち、形質転換したその大腸菌を培養し、それからcDNA 断片を有するプラスミドDNA を抽出すれば、これを例えば塩基配列の決定等の構造解析に用いることができる。

さらに、上記の原核生物の遺伝子発現解析方法であって、前記cDNA 断片回収工程後、前記連結工程前に、回収した前記cDNA 断片について、前記第1 アダプター配列に相補的な配列を有する第3 プライマーと、前記第2 アダプター配列に相補的な配列を有する第4 プライマーとを用いて、PCR 反応を行う第2 PCR 工程を備えると良い。

本発明によれば、cDNA 断片回収工程後、連結工程前に、回収したcDNA 断片について、第1 アダプター配列に相補的な配列を有する第3 プライマーと、第2 アダプター配列に相補的な配列を有する第4 プライマーとを用いて、PCR 反応を行う第2 PCR 工程を備える。

このような工程を行えば、cDNA 断片回収工程で回収したcDNA 断片が少量しか

なくても、それを大幅に増幅させることができる。従って、効率よくcDNA断片をプラスミドベクターに連結し、大腸菌に導入することができる。

なお、このPCR工程で使用する第3プライマーは、第1アダプター配列に相補的な配列を有するものであればよく、例えば、上記の第1プライマーを利用しても良い。但し、後の導入工程を考慮して、適当な制限酵素の認識配列を有する第3プライマーを利用すれば、導入工程を効率よく、また、確実に行うことができる。同様に、第4プライマーは、第2アダプター配列に相補的な配列を有するものであればよく、例えば、上記の第2プライマーを利用しても良いが、適当な制限酵素の認識配列を有する第4プライマーを利用すれば、導入工程を効率よく、また、確実に行うことができる。

#### BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

図1は、目的とするcDNA断片を回収するためのサンプルとなるcDNA断片群の作成方法についての概要を示す説明図である。

図2は、目的とするcDNA断片を回収するためのサンプルとなるcDNA断片群の作成方法についての詳細を示す説明図である。

図3は、rRNAを除去する方法を説明する説明図である。

図4(a)は、第1アダプター配列を示す説明図である。

図4(b)は、第2アダプター配列を示す説明図である。

図5は、256種類のcDNA断片群に分類するためのプライマーセットの配列を示す説明図である。

図6は、cDNA断片の群から目的とするcDNA断片を回収する方法を示す説明図である。

図7は、アンピシリン耐性遺伝子の塩基配列と、その中のHhaI切断部位及びSau3AI切断部位を示す説明図である。

図8は、RT-PCRで増幅したcDNA断片の群を電気泳動した結果を示す、図面に変わる写真である。

## DETAILED DESCRIPTION OF THE PRESENT INVENTION

以下、本発明の実施例を、図を参照しつつ説明する。

まず、原核生物の細胞において発現された遺伝子を以下のように分類する。即ち、原核生物の細胞から全RNA を抽出しさらにmRNA を精製する。そして、mRNAの3'末端にポリA を付加する。その後、このポリA を利用してmRNA からcDNA 群を合成する。その後、得られたcDNA 群を適切な2 つの制限酵素によって切断し、また、両端にアダプター配列を結合して、識別可能なだけの長さを有しかつ両端にアダプター配列を有するアダプター付きcDNA 断片の群を作成する。その後、アダプター付きcDNA 断片の群を、256 種類のプライマーセットを用いて256 個の群に分類する。

この分類の手法を図1 を参照しつつ説明する。mRNA からなる群1 からcDNA の群2 を合成する。これを適切な2 つの制限酵素によって切断してcDNA 断片の群3を得る。そして、このcDNA 断片の両末端の各2 塩基、全4 塩基の配列に応じて、即ち、4 塩基がA 、T 、G 、C のいずれであるかにより、cDNA 断片の群3 を分類する。具体的には、5' 末端の塩基(図1 中に黒塗りで示す。)によってまず4 個の群4 に分類する。そして、これは次の2 番目の塩基(図1 中に黒塗りで示す。)によってさらに16 個の群5 に分類する。さらに、3' 末端の2 番目の塩基(図1 中に黒塗りで示す。)によって64 個の群6 に分類し、さらに、3' 末端の塩基(図1 中に黒塗りで示す。)により256 個の群7 に分類する。

次に、細胞からmRNA を抽出し、mRNA の群1 から256 種類のcDNA 断片の群7 を調製する手法について、図2 及び図3 を参照しつつ具体的に説明する。図2 における各アルファベットは塩基配列を構成する塩基を示すが、N 、M 、W 、X 、Y 及びZ は任意の塩基を示し、X とY 及びW とZ は、互いに相補的に結合する。

本実施例においては、原核生物の遺伝子発現解析をするにあたり、大腸菌に組み入れたアンピシリン耐性遺伝子(blaM) を標的遺伝子として解析を行った。

まず、mRNA 抽出工程において、試験対象となる原核生物の細胞からmRNA 10 を抽出する。

具体的には、原核生物の細胞から全RNA を抽出する。その後、16S rRNA の一

部に相補的な配列を有する第1 ヌクレオチドを16S rRNA にハイブリダイズさせると共に、23S rRNA の一部に相補的な配列を有する第2 ヌクレオチドを23S rRNA にハイブリダイズさせる。次に、第1 ヌクレオチドのうち、16S rRNA に相補的な部位とは別の部位に対し相補的である配列を有する第3 ヌクレオチドが付加された第1 タグ物質を、16S rRNA と上記第1 ヌクレオチドの結合物にハイブリダイズさせる。また、第2 ヌクレオチドのうち、23S rRNA に相補的な部位とは別の部位に対し相補的である配列を有する第4 ヌクレオチドが付加された第2 タグ物質を、23S rRNA と第2 ヌクレオチドの結合物にハイブリダイズさせる。その後、全RNAから、16S rRNA と第1 ヌクレオチドと第3 ヌクレオチドが付加された第1 タグ物質との結合物を除去すると共に、23S rRNA と第2 ヌクレオチドと第4 ヌクレオチドが付加された第2 タグ物質との結合物を除去する。

好ましくは、第1 ヌクレオチドと第2 ヌクレオチドを、16S rRNA と23S rRNA が持つ共通配列に対し相補的である配列を有する同一のものとする。また、第3 ヌクレオチドと第4 ヌクレオチドも同一のものとする。さらに、第1 タグ物質と第2 タグ物質も同一のものとする。

即ち、図3 に示すように、全RNA を抽出した後、16S rRNA と23S rRNA が持つ共通配列に対し相補的である配列を有する第1 ヌクレオチド3 2 を、16S rRNA と23S rRNA にそれぞれハイブリダイズさせる。次に、第1 ヌクレオチドのうち、16S rRNA に相補的な部位とは別の部位に対し相補的である配列を有する第3 ヌクレオチド3 3 が付加された第1 タグ物質3 4 を、16S rRNA または23S rRNA と第1 ヌクレオチド3 2 との結合物にそれぞれハイブリダイズさせる。その後、全RNA から、16S rRNA または23S rRNA と、第1 ヌクレオチド3 2 と、第3 ヌクレオチド3 3 が付加された第1 タグ物質3 4 との結合物をそれぞれ除去する。

本実施例では、アンビシリン耐性遺伝子を持つ大腸菌、即ち、プラスミドpBluescriptを持つ大腸菌 (DH5  $\alpha$  株) を培養し、その細胞から、まず、全RNA を抽出した。この全RNA の抽出には、RNA 抽出キット (Rneasy Protect Bacterial Mini Kit) を用いて、添付のマニュアルに従って抽出した。その後、抽出した全RNA 10  $\mu$ g を用いて、mRNA を精製した。この精製には、MICROB Express Bacterial mRNA

Isolation Kit (Ambion 社製) を利用した。精製法は、添付のマニュアルに従った。

次に、ポリA 付加工程において、mRNA 1 0 の3'末端にポリA を付加し、ポリA が付いたmRNA 1 1 を得る（図2 参照）。

このポリA 化反応の反応組成は次の通りである。なお、5 ×PolyA buffer は、宝酒造のPolyA Polymerase 添付の組成を参考に作成した。また、PolyA Polymerase は、宝酒造製のものを使用した。

|                      |              |
|----------------------|--------------|
| mRNA 500ng           | X $\mu$ l    |
| 5 ×PolyA buffer      | 4 $\mu$ l    |
| 5 ×MnCl <sub>2</sub> | 4 $\mu$ l    |
| PolyA Polymerase     | 1 $\mu$ l    |
| DEPC 处理水             | 11-X $\mu$ l |
| Total                | 20 $\mu$ l   |

上記の反応液を37 °Cで1 時間インキュベートした。その後、反応液に TE buffer 180  $\mu$ l とフェノール・クロロフォルム溶液200  $\mu$ l を加えて混合した。続いて、この混合液を15,000rpm で5 分間、室温で遠心分離した。そして、上澄み溶液を185  $\mu$ l (92.5  $\mu$ l ×2 ) 吸い取った。続いて、この上澄み溶液に3M 酢酸ナトリウムを18.5  $\mu$ l 加えて混合した。さらに、この溶液に520  $\mu$ l の99.5 % エタノールを加えて混合した。その後、この溶液を-80 °Cで10 分間保冷した。次に、これを15,000rpm で5 分間、4 °Cで遠心分離した後、70 %エタノールで沈殿をリーンスした。続いて、これを15,000rpm で5 分間、4 °Cで遠心分離した後、上澄みを除去した。その後、沈殿を風乾させ、DEPC 处理水7  $\mu$ l に溶解した。このようにして、mRNA の3'末端にポリA テイルを付加させた。

次に、cDNA 合成工程において、ポリA が付加されたmRNA 1 1 から逆転写酵素を用いてcDNA 1 2 を合成する。またその際、cDNA の5'末端にタグ物質を付加する。本実施例では、mRNA の3'末端側のポリA テイルに相補的なオリゴdT プライマーをビオチン（タグ物質）で標識化しものをプライマーとして用いて、cDNA を合成した。

|                                       |            |
|---------------------------------------|------------|
| PolyA mRNA 溶液 (mRNA 量は500ng )         | 7 $\mu$ l  |
| 10mM dNTP Mix                         | 1 $\mu$ l  |
| 50 $\mu$ M Biotin-Not I anchored dt18 | 2 $\mu$ l  |
| Total                                 | 10 $\mu$ l |

まず、上記の混合物を65 °Cで5 分間加温後、氷中に1 分間以上放置した。

一方で、下記の混合物を作成した。なお、この混合物の作成には、インビトロジェン社のスーパースクリプトファーストストランドシステムを使用した。

|                        |            |
|------------------------|------------|
| 10 $\times$ RT buffer  | 2 $\mu$ l  |
| 25mM MgCl <sub>2</sub> | 4 $\mu$ l  |
| 0.1M DTT               | 2 $\mu$ l  |
| RNase out              | 1 $\mu$ l  |
| Super Script II        | 1 $\mu$ l  |
| Total                  | 10 $\mu$ l |

そして、この混合物を氷中で保冷した上記混合物に加えて混合した後、42 °Cで1 時間インキュベートした。この反応液を1st Strand Mix とする。

また一方で、下記の混合物（これを2nd Strand Mix とする。）を作成した。

この混合物は、インビトロジェン社製のものを利用した。

|                              |             |
|------------------------------|-------------|
| 5 $\times$ 2nd Strand buffer | 30 $\mu$ l  |
| 10mM dNTP Mix                | 4 $\mu$ l   |
| 0.1M DTT                     | 2 $\mu$ l   |
| E.coli Ligase                | 2 $\mu$ l   |
| E.coli polymerase            | 4 $\mu$ l   |
| RNaseH                       | 1 $\mu$ l   |
| DEPC 处理水                     | 87 $\mu$ l  |
| Total                        | 130 $\mu$ l |

そして、この混合物を、上記の1st strand 合成反応が終了するまで氷中に保存した。

次に、冷却した2nd Strand Mix 130  $\mu$ l を、上記の1st Strand Mix に加えて混合した後、16 °Cで2 時間反応させた。その後は、70 °Cで15 分間反応させて、

酵素を失活させた。

反応終了後は、TE buffer 150  $\mu$ l を加え、さらに、フェノール・クロロフォルム溶液（和光純薬）を300  $\mu$ l 加えて混合した。統いて、15,000rpmで5分間、室温で遠心分離した。その後、上澄み溶液を280  $\mu$ l 吸い取り、これに3M 酢酸ナトリウムを28  $\mu$ l 加えて混合した。

その後、さらに770  $\mu$ l の99.5 %エタノールを加えて混合した。そして、-80 °Cで10分間保冷した。次に、これを15,000rpmで15分間、4 °Cで遠心分離した後、70%エタノールで沈殿をリーンスした。統いて、これを15,000rpmで3分間、4 °Cで遠心分離した後、上澄みを除去した。その後、沈殿を風乾させ、10mM Tris 25  $\mu$ l に溶解した。このようにして、mRNA からcDNA を合成した。

次に、cDNA 加工工程について説明する。

まず、第1 切断工程において、合成されたcDNA 1 2 を第1 制限酵素を用いて切断する。

本実施例では、下記の混合物を作成し、37 °Cで一晩放置した。なお、第1 制限酵素として、4 塩基認識制限酵素の1 つであるHha I を用いた。

|             |            |
|-------------|------------|
| cDNA 溶液     | 23 $\mu$ l |
| M buffer    | 5 $\mu$ l  |
| Hha I (20U) | 2 $\mu$ l  |
| Water       | 20 $\mu$ l |
| Total       | 50 $\mu$ l |

次に、65 °Cで15分間加温し、酵素を失活させた。その後、3M 酢酸ナトリウム（和光純薬）を5  $\mu$ l 加え、さらに99.5 %エタノールを160  $\mu$ l 加えて混合した。そして、-80 °Cで10分間保冷した。次に、これを15,000rpmで15分間、4 °Cで遠心分離した後、70%エタノールで沈殿をリーンスした。統いて、これを15,000rpmで3分間、4 °Cで遠心分離した後、上澄みを除去した。その後、沈殿を風乾させた。

次に、第1 アダプター結合工程において、切断されたcDNA 断片に、第1 制限酵素の切断部位の配列に相補的な配列を有する第1 アダプター配列を結合させる。

本実施例では、風乾した沈殿を、5  $\mu$ l の1pmol/ $\mu$ l の第1 アダプター溶液に溶解し、宝酒造のLigation kit の1 液を5  $\mu$ l 加えて混合した後、16 °Cで2 時間反応させた。なお、第1 アダプター配列を図4 (a) に示した。

次に、第1 回収工程において、タグ物質に高親和性を有する高親和性物質を結合させることにより、タグ物質を有するcDNA 断片を回収する。

本実施例では、ストレプトアビジン（高親和性物質）14 を用いてビオチン13 を捕捉し、切断されたcDNA 断片の3'末端側のみを回収した。具体的には、反応液にTE buffer を90  $\mu$ l 加え、さらに、ビーズ懸濁液（ダイナル社製）を100  $\mu$ l 加えた。そして、磁気ビーズに固定したストレプトアビジン14 に結合させることにより、切断されたcDNA 断片の3'末端側を回収した。

次に、第2 切断工程において、回収したcDNA 断片を第2 制限酵素を用いて切断する。

本実施例では、下記の混合物（2 サンプル分）を作成した。なお、第1 制限酵素として、4 塩基認識制限酵素の1 つであるSau3AI を用いた。

|          |             |
|----------|-------------|
| Sau3AI   | 10 $\mu$ l  |
| H buffer | 40 $\mu$ l  |
| Water    | 250 $\mu$ l |
| Total    | 300 $\mu$ l |

そして、この混合液を上記のビーズ入りチューブに150  $\mu$ l 添加して混合する。そして、37 °Cで3 時間保温する。

次に、第2 回収工程において、高親和性物質に結合させることにより、タグ物質を有するcDNA 断片を除去し、タグ物質を有しないcDNA 断片を回収する。

具体的には、上記の反応終了後に、マグネットスタンドにチューブを立ててビーズを引きつけ、上澄み185  $\mu$ l を新しいチューブに移す。そして、再度、TE buffer 100  $\mu$ l をビーズ入りチューブに入れて混合する。その後、再びマグネットスタンドにチューブを立ててビーズを引きつけ、上澄み85  $\mu$ l を新しいチューブに移す。

次に、サンプル270  $\mu$ l に対して、3M 酢酸ナトリウムを27  $\mu$ l 、エタノールを750  $\mu$ l 、ペイントペレット（宝酒造）を2  $\mu$ l 加えて混合する。そして、-20 °C

で一晩放置する。その後、これを15,000rpmで15分間、4℃で遠心分離した後、70%エタノール500μlで沈殿をリノスした。続いて、これを15,000rpmで3分間、4℃で遠心分離した後、上澄みを除去した。その後、沈殿を風乾させた。

次に、第2アダプター結合工程において、回収されたcDNA断片に、第2制限酵素の切断部位の配列に相補的な配列を有する第2アダプター配列を結合させる。

本実施例では、風乾した沈殿を、5μlの1pmol/μlの第2アダプター溶液に溶解し、宝酒造のLigation kit ver.2のI液を5μl加えて混合した後、16℃で2時間反応させた。なお、第2アダプター配列を図4(b)に示した。

次に、TE buffer 190μlと加え、さらに、フェノール・クロロフォルム溶液を200μl加えて混合した。続いて、15,000rpmで10分間、室温で遠心分離した。その後、上澄み溶液185μlを新しいチューブに移した。そして、これに3M酢酸ナトリウムを20μl加えて、さらに99.5%エタノールを510μlを加えて混合した。

その後、-80℃で20分間保冷した。次に、これを15,000rpmで15分間、4℃で遠心分離した後、70%エタノール200μlで沈殿をリノスした。続いて、これを15,000rpmで3分間、4℃で遠心分離した後、上澄みを除去した。その後、沈殿を風乾させ、TE buffer 50μlに溶解した。

以上のcDNA加工工程において、両末端に既知配列を含むアダプター付きcDNA断片17の群が構築される。

次に、第1PCR工程において、アダプター付きcDNA断片17の群について、第1アダプター配列に相補的な配列を有する第1プライマーと、第2アダプター配列に相補的な配列を有する第2プライマーとを用いて、PCR反応を行う。本実施例では、このプライマーセットとして、図5(a)に示すように、第1アダプター配列に相補的な配列と、増幅させる方向にさらに2塩基の配列(図5中にNNで示す。)を有するプライマーと、図5(b)に示すように、第2アダプター配列に相補的な配列と、増幅させる方向にさらに2塩基の配列を有するプライマー(図5中にNNで示す。)とを使用する。それぞれのプライマーの増幅される方向に付与した2塩基は、A、T、G、Cの4種類の塩基からなる全て

の組合せによって設計されるので、合計256 種類のプライマーセットを考えられる。従って、これらすべてのプライマーセットを用いて、cDNA 断片17 の群についてPCRを行うことにより、256 種類のcDNA 断片18 の群に分類すると共に、PCR 増幅を行うことが可能である。なお、PCR は、公知の手法により行えばよい。以上のようにして得た256 種類のcDNA 断片18 の群は、目的とするcDNA 断片を回収するためのサンプルとして利用することができる。

次に、256 種類のcDNA 断片の群の中から1 つのcDNA 断片の群をサンプルとして選択し、以下に示す手法により、目的とするcDNA 断片を回収する。この手法については、図6 を参照しつつ説明する。

まず、第1 PCR 工程において、cDNA 断片の群21 について、第1 アダプター配列15 に相補的な配列を有し、かつ、標識物質が結合された第1 プライマーと、第2 アダプター配列16 に相補的な配列を有する第2 プライマーとを用いて、PCR 反応により増幅させる。

具体的には、第1 アダプター配列15 に相補的な配列を有するオリゴヌクレオチド1 に、蛍光物質である近赤外蛍光色素IRD-800 が結合された第1 プライマーと、第2 アダプター配列16 に相補的な配列を有するオリゴヌクレオチド2 からなる第2 プライマーとを用いて、PCR 反応を行った。第1 , 第2 プライマーは、それぞれ公知の手法により合成すればよい。

オリゴヌクレオチド1 :

5'-cataggatcagatcagttgcgcctc-3'

オリゴヌクレオチド2 :

5'-gcactagtgcatacgcaacttgaaacgatgtctg-3'

PCR 反応の反応組成は、次の通りである。なお、KOD Dash 、dNTPs 、

10 ×buffer

は、東洋紡のものを使用した。

cDNA 0.5 ～5ng

KOD Dash 2.5U

dNTPs 0.2mM (最終濃度)

10 ×buffer 5  $\mu$ l

IRD-800 蛍光標識プライマー 5pmol

Reverse primer 10pmol

Total 50  $\mu$ l

また、PCR 反応は、バーキンエルマー社製の GeneAmp 2400 を用いて行った。

PCR 条件は、Stepdown PCR (Biotechniques, 1996, 20 : 478-485 を参照されたい。

本実施例では、アンピシリン耐性遺伝子の3'末端側が釣り上げられるはずであるので、図7 に塩基配列とHhaI サイト及びSau3AI サイトと示すアンピシリン耐性遺伝子の658-826 の断片が増幅してくるはずである。また、第1, 第2アダプター配列を考慮すると、214bp のアダプター付きcDNA 断片が増幅されるはずである。

次に、電気泳動工程において、第1 PCR 工程で増幅されたcDNA 断片の群2 2 (PCR 産物) についてゲル電気泳動を行う。

本実施例では、増幅したcDNA 断片の群2 2 を、蛍光色素の読み取れるDNA シークエンサー (LI-COR 社製LIC-4200L(S)-1) に供試し、サイズ分画のためにアクリルアミドゲル電気泳動を行った。アクリルアミドゲル2 3 の組成は、上記DNA シークエンサーに付属のマニュアルに従った。

次に、cDNA 断片回収工程において、電気泳動の結果に基づいて、ゲルから目的のcDNA 断片2 4 を含むゲルを切り出し、当該cDNA 断片2 4 を回収する。

本実施例では、アクリルアミドゲル電気泳動を行った結果、図8 に示すように、推定通りの位置にバンド (214bp) が現れた。なお、図8 はシークエンサのデータより取得した画像である。次に、電気泳動を行ったゲルについて、滤紙を使用してゲルをゲル板から剥がした。続いて、滤紙にくっついたゲルを蛍光色素の検出できるスキャナー上に載置し、ゲル全体をイメージ化した。そして、目的のcDNA 断片がゲル中のどの位置にあるかを把握し、この目的のcDNA 断片を含むゲルを切り出した。なお、本実施例では、LI-COR 社のゲルイメージングシステムオデッセイを使用した。その後、切り出したアクリルアミドゲルから目的のcDNA 断片を回収した。このDNA の抽出は、Omega Bio-tek 社のE. Z. N. A. Poly-Gel DNA

Extraction kit を使用した。

次に、第2 PCR 工程において、回収したcDNA 断片2 4 について、第1 アダプター配列1 5 に相補的な配列を有する第3 プライマーと、第2 アダプター配列1 6 に相補的な配列を有する第4 プライマーとを用いて、再度PCR 反応を行う。具体的には、フォワード側には、第1 アダプター配列に相補的な配列を有すると共に制限酵素NotI 部位の配列を有する第3 プライマーを、リバース側には、第2 アダプター配列に相補的な配列を有すると共に制限酵素SpeI 部位の配列を有する第4 プライマーを用いて、PCR 反応を行った。第3 プライマーは、オリゴヌクレオチド3 からなり、第4 プライマーは、オリゴヌクレオチド4 からなる。

オリゴヌクレオチド3 :

5'-cagcggccgctcataggatcagatcagttgcgcctc-3'

オリゴヌクレオチド4 :

5'-gcactatgtcaatcgcacttgaacgatgtatctg-3'

また、このPCR 工程においても、PCR 反応は、パーキンエルマー社製の GeneAmp 2400 を用い、Stepdown PCR (Biotechniques, 1996, 20 : 478-485 を参考されたい。) の条件により行った。使用した酵素 (DNA ポリメラーゼ) は、東洋紡社製の KOD Dash 酵素である。反応液の組成は、添付のマニュアルに従った。

次に、連結工程において、第2 PCR 工程で増幅したcDNA 断片2 4 の産物をプラスミドベクター2 5 に連結し、組換え体プラスミド2 6 を形成する。

具体的には、増幅したcDNA 断片2 4 の産物を制限酵素NotI とSpeI で処理した上で、プラスミドベクター (pbluescriptII) 2 5 に連結し、組換え体プラスミド2 6 を形成した。この連結は、宝酒造社製のライゲーションキットver. 2 を使用し、その添付マニュアルに従って行った。

次に、導入工程において、組換え体プラスミド2 6 を大腸菌に導入する。

本実施例では、コンピテントセルとして *E. coli* DH5  $\alpha$  を使用し、公知の手法により、組換え体プラスミド2 6 を大腸菌に導入した。

次に、形質転換した大腸菌から、公知の手法により組換え体プラスミドを抽出

した。このプラスミドの抽出は、複数個のコロニーについて行った。そして、抽出したそれぞれの組換え体プラスミドについて、組み込まれたcDNA 断片の塩基配列を決定した。その結果、cDNA 断片は、確かに、アンピシリン耐性遺伝子の一部であった。

以上で説明したように、本実施例では、まず、原核生物の細胞からmRNA を抽出する。その後、抽出したmRNA の3'末端にポリA テイルを付加する。そして、このポリA テイルを利用して、mRNA からcDNA を合成する。次に、cDNA 加工工程において、cDNA から一端に第1 アダプター配列を有し他端に第2 アダプター配列を有するアダプター付きcDNA 断片を作成する。その後、このアダプター付きcDNA 断片に対して、第1 アダプター配列に相補的な配列を有する第1 プライマーと、第2 アダプター配列に相補的な配列を有する第2 プライマーとを用いて、PCR 反応を行う。次に、PCR で増幅されたcDNA 断片について電気泳動を行う。そして、この電気泳動の結果に基づいて、目的のcDNA 断片を回収し、遺伝子発現解析に利用する。

このような方法では、細胞から抽出したmRNA にポリA を付加するので、これを利用することで容易にcDNA を合成することができる。従って、原核生物であっても、その遺伝子発現解析を容易に行うことができる。

さらに、cDNA から両端にアダプター配列を持つcDNA 断片を作成し、これらのアダプター配列に相補的な配列を有するプライマーセットを用いてPCR 反応を行うので、cDNA 断片を多量に増幅することができる。従って、cDNA 断片の群の中に存在する目的のcDNA 断片が低濃度であっても、それを大幅に増幅することができ、電気泳動においてそれを容易に検出することができる。また、後述するように、第1、第2 プライマーを適宜選択することにより、両端にアダプター配列を持つcDNA 断片群の中から、一部のcDNA 断片だけを選択的に増幅することができるため、遺伝子発現解析をより容易に行うことができる。

また、本実施例のmRNA 抽出工程では、まず、原核生物の細胞から全RNA を抽出する。そして、抽出した全RNA に対し、16S rRNA の一部に相補的な配列を有する第1 ヌクレオチドを16S rRNA にハイブリダイズさせると共に、23S rRNA の一部に相補的な配列を有する第2 ヌクレオチドを23S rRNA にハイブリダイズさせ

る。

その後、第1ヌクレオチドのうち、16S rRNA に相補的な部位とは別の部位に対し相補的な配列を有する第3ヌクレオチドが付加された第1タグ物質を、16S rRNAと第1ヌクレオチドの結合物にハイブリダイズさせる。また、第2ヌクレオチドのうち、23S rRNA に相補的な部位とは別の部位に対し相補的な配列を有する第4ヌクレオチドが付加された第2タグ物質を、23S rRNA と第2ヌクレオチドの結合物にハイブリダイズさせる。その後、全RNA から、16S rRNA と第1ヌクレオチドと第3ヌクレオチドが付加された第1タグ物質との結合物を除去すると共に、23SrRNA と第2ヌクレオチドと第4ヌクレオチドが付加された第2タグ物質との結合物を除去する。

さらに具体的には、第1ヌクレオチドと第2ヌクレオチドは、16S rRNA と23S rRNA が持つ共通配列に相補的な配列を有する同一の配列からなる。また、第3ヌクレオチドと第4ヌクレオチドも同一の配列からなる。さらに、第1タグ物質と第2タグ物質も同一物である。

従って、全RNA から、全RNA の中に多量に存在する16S rRNA と23S rRNA の大部分を除去することができる。従って、mRNA を容易により高純度に精製することができる。また、第1ヌクレオチドと第2ヌクレオチド、第3ヌクレオチドと第4ヌクレオチド、第1タグ物質と第2タグ物質は、それぞれ1種類で足りるため、16SrRNA と23SrRNA の除去がさらに容易にできる。

また、本実施例では、cDNA 合成工程において、cDNA を合成すると共にcDNA の5'末端にタグ物質を付加しておく。

そして、cDNA 加工工程において、まず、cDNA を第1制限酵素で切断する。その後、切断されたcDNA 断片に、第1制限酵素の切断部位の配列に相補的な配列を有する第1アダプター配列を結合させる。その後、タグ物質に高親和性を有する高親和性物質に結合させることにより、タグ物質を有するcDNA 断片を回収し、タグ物質を有しないcDNA 断片を除去する。即ち、cDNA の5'末端側 (PolyT 末端側) のcDNA 断片を回収し、3'末端側のcDNA 断片を除去する。

次に、第1アダプター配列が結合されたcDNA 断片を第2制限酵素で切断する。その後、高親和性物質に結合させることにより、今度は、タグ物質を有するcDNA

断片を除去し、タグ物質を有しないcDNA 断片を回収する。即ち、第1 アダプターが結合された側のcDNA 断片を回収し、第1 アダプターがない側のDNA 断片を除去する。その後、この回収されたcDNA 断片に、第2 制限酵素の切断部位の配列に相補的な配列を有する第2 アダプター配列を結合させる。.

このため、一端に第1 アダプター配列を有し他端に第2 アダプター配列を有するアダプター付きcDNA 断片を容易に作成することができる。また、このようにして作成されたcDNA 断片の群は、細胞で発現されたほとんど全ての遺伝子、即ち、公知の遺伝子も未知の遺伝子も同様に、その群の中に含まれるようにすることができる。従って、遺伝子発現解析において有効に活用することができる。

また、本実施例では、電気泳動工程は、ゲル電気泳動を行う。また、cDNA 断片回収工程は、電気泳動を行ったゲルから目的のcDNA 断片を含むゲルを切り出し、そのcDNA 断片を回収する。

このようにcDNA 断片の群をゲル電気泳動によって分画すれば、例えばキャピラリーカラムによる電気泳動に比べ、サイズ分解能を向上させることができる。このため、目的とするcDNA 断片のみをより特異的に回収することができる。

また、本実施例では、第1 プライマーには、標識物質が付与されている。そして、電気泳動において、この標識物質を検出する。

このように、標識物質を有するプライマーを用いてPCR を行えば、PCR 産物も標識物質を有することになる。従って、PCR 反応を行っても依然として目的とするcDNA 断片が比較的少ない場合であっても、電気泳動においてこの標識物質を認識することで、目的とするcDNA 断片のゲル中の位置を容易に検出することができる。

また、本実施例では、第1 制限酵素としてHhaI を使用し、第2 制限酵素としてSau3AI を使用している。

このような酵素を利用することにより、cDNA 断片を識別可能な長さを有する断片に切断することができる。また、合成されたcDNA 断片のより多くを切断することができる。

また、本実施例では、タグ物質としてビオチンを利用し、高親和性物質としてストレプトアビシンを利用している。このようなものを使用することは、その取

り扱いの容易性や入手容易性などの理由から特に好ましい。

また、本実施例では、cDNA 断片回収工程後、回収したcDNA 断片をプラスミドベクターに連結し、組換え体プラスミドを形成する連結工程を備える。また、組換え体プラスミドを大腸菌に導入する導入工程を備える。

このように、回収した目的のcDNA 断片をプラスミドベクターに連結し、大腸菌に導入しておけば、cDNA 断片の構造解析をする場合などに有効である。即ち、形質転換したその大腸菌を培養し、それからcDNA 断片を有するプラスミドDNAを抽出すれば、これを例えれば塩基配列の決定等の構造解析に用いることができる。

また、本実施例では、cDNA 断片回収工程後、連結工程前に、回収したcDNA 断片について、第1 アダプター配列に相補的な配列を有する第3 プライマーと、第2 アダプター配列に相補的な配列を有する第4 プライマーとを用いて、PCR 反応を行う第2 PCR 工程を備える。

このような工程を行えば、cDNA 断片回収工程で回収したcDNA 断片が少量しかなくても、それを大幅に増幅させることができる。従って、効率よくcDNA 断片をプラスミドベクターに連結し、大腸菌に導入することができる。

以上において、本発明の実施の形態を実施例に即して説明したが、本発明は上記実施例に限定されるものではなく、その要旨を逸脱しない範囲で、適宜変更して適用できることは言うまでもない。

例えば、上記実施例のcDNA 加工工程では、第1 切断工程、第1 回収工程、及び、第1 アダプター結合工程について、第1 切断工程、第1 アダプター結合工程、第1 回収工程の順序で行っているが、これらの工程を、第1 切断工程、第1 回収工程、第1 アダプター結合工程の順序で行うようにしてもよい。

また、上記実施例のcDNA 加工工程では、第2 切断工程、第2 回収工程、及び、第2 アダプター結合工程について、第2 切断工程、第2 回収工程、第2 アダプター結合工程の順序で行っているが、これらの工程を、第2 切断工程、第2 アダプター結合工程、第2 回収工程の順序で行うようにしてもよい。

#### 【配列表】

<110>アイシン精機株式会社

AISIN SEIKI CO., LTD

<120 >DNA 回収法  
<130 >A K O 2 0 5 2 6  
<160 >4  
<210 >1  
<211 >24  
<212 >DNA  
<213 >Artificial Sequence  
<220 >  
<223 >第1 アダプター配列を参考にして合成  
<400 >1  
cataggatca gatcagttgc gctc 24  
<210 >2  
<211 >33  
<212 >DNA  
<213 >Artificial Sequence  
<220 >  
<223 >第2 アダプター配列を参考にして合成  
<400 >2  
gcactagttgc aatcgccactt gaacgatgtat ctg 33  
<210 >3  
<211 >35  
<212 >DNA  
<213 >Artificial Sequence  
<220 >  
<223 >第1 アダプター配列と制限酵素NotI 部位の配列を参考にして合成  
<400 >3  
cagcggccgc tcataggatc agatcagttgc cgctc 35  
<210 >4  
<211 >33

<212 >DNA

<213 >Artificial Sequence

<220 >

<223 >第2 アダプター配列と制限酵素SpeI 部位の配列を参考にして合成

<400 >3

gcactagtgc aatcgactt gaacgatgat ctg 33

WHAT IS CLAIMED IS:

Claim 1

原核生物の細胞からmRNA を抽出するmRNA 抽出工程と、  
上記mRNA の3'末端にポリA を付加するポリA 付加工程と、  
上記ポリA が付加されたmRNA からcDNA を合成するcDNA 合成工程と、  
上記cDNA から一端に第1 アダプター配列を有し他端に第2 アダプター配列を  
有するアダプター付きcDNA 断片を作成するcDNA 加工工程と、  
上記アダプター付きcDNA 断片について、上記第1 アダプター配列に相補的な配  
列を有する第1 プライマーと、上記第2 アダプター配列に相補的な配列を有す  
る第2 プライマーとを用いて、PCR 反応を行う第1 PCR 工程と、  
上記第1 PCR 工程で増幅されたcDNA 断片について電気泳動を行う電気泳動工程と、  
上記電気泳動の結果に基づいて、目的のcDNA 断片を回収するcDNA 断片回収工程  
と、  
を備えることを特徴とする原核生物の遺伝子発現解析方法。

Claim 2

クレーム1 に記載の原核生物の遺伝子発現解析方法であって、  
前記mRNA 抽出工程は、  
前記原核生物の細胞から全RNA を抽出する工程と、  
16S rRNA の一部に相補的な配列を有する第1 ヌクレオチドを上記16S rRNAにハ  
イブリダイズさせると共に、23S rRNA の一部に相補的な配列を有する第2 ヌクレ  
オチドを23S rRNA にハイブリダイズさせる工程と、  
上記第1 ヌクレオチドのうち、上記16S rRNA に相補的な部位とは別の部位に対  
し相補的である配列を有する第3 ヌクレオチドが付加された第1 タグ物質を、  
上記16S rRNA と上記第1 ヌクレオチドの結合物にハイブリダイズさせると共に、  
上記第2 ヌクレオチドのうち、上記23S rRNA に相補的な部位とは別の部位に対  
し相補的である配列を有する第4 ヌクレオチドが付加された第2 タグ物質を、  
上記23S rRNA と上記第2 ヌクレオチドの結合物にハイブリダイズさせる工程と、  
上記全RNA から、上記16S rRNA と上記第1 ヌクレオチドと上記第3 ヌクレオチ

ドが付加された上記第1 タグ物質との結合物を除去すると共に、上記23S rRNA と上記第2 ヌクレオチドと上記第4 ヌクレオチドが付加された上記第2 タグ物質との結合物を除去する工程と、  
を有することを特徴とする原核生物の遺伝子発現解析方法。

#### Claim 3

クレーム2に記載の原核生物の遺伝子発現解析方法であって、  
前記第1 ヌクレオチドと前記第2 ヌクレオチドは、前記16S rRNA と前記23S rRNA が持つ共通配列に対し相補的である配列を有する同一のものであり、  
前記第3 ヌクレオチドと前記第4 ヌクレオチドも同一のものであり、  
前記第1 タグ物質と前記第2 タグ物質も同一のものであることを特徴とする原核生物の遺伝子発現方法。

#### Claim 4

クレーム1に記載の原核生物の遺伝子発現解析方法であって、  
前記cDNA 合成工程は、前記cDNA を合成すると共に上記cDNA の5'末端にタグ物質を付加し、  
前記cDNA 加工工程は、  
上記cDNA を第1 制限酵素で切断する第1 切断工程と、  
上記タグ物質に高親和性を有する高親和性物質に結合させることにより、上記タグ物質を有するcDNA 断片を回収する第1 回収工程と、  
上記タグ物質を有するcDNA 断片に、上記第1 制限酵素の切断部位の配列に相補的な配列を有する第1 アダプター配列を結合させる第1 アダプター結合工程と、  
上記第1 アダプター配列が結合されたcDNA 断片を第2 制限酵素で切断する第2 切断工程と、  
上記高親和性物質に結合させることにより、上記タグ物質を有するcDNA 断片を除去し、上記タグ物質を有しないcDNA 断片を回収する第2 回収工程と、  
上記タグ物質を有しないcDNA 断片に、上記第2 制限酵素の切断部位の配列に相

補的な配列を有する第2アダプター配列を結合させる第2アダプター結合工程と、を有することを特徴とする原核生物の遺伝子発現解析方法。

Claim 5

クレーム1に記載の原核生物の遺伝子発現解析方法であって、  
前記電気泳動工程は、ゲル電気泳動を行い、  
前記cDNA断片回収工程は、ゲルから目的の前記cDNA断片を含むゲルを切り出し、  
当該cDNA断片を回収することを特徴とする原核生物の遺伝子発現解析方法。

Claim 6

クレーム1に記載の原核生物の遺伝子発現解析方法であって、  
前記第1プライマー及び前記第2プライマーの少なくともいずれかには、標識物質が付与されており、  
前記電気泳動において、上記標識物質を検出することを特徴とする原核生物の遺伝子発現解析方法。

Claim 7

クレーム4に記載の原核生物の遺伝子発現解析方法であって、  
前記タグ物質と前記高親和性物質の組み合わせが、ビオチンとストレプトアビシン、ビアチンとアビシン、FITCとFITI抗体、及び、DIGとアンチDIGのいずれかであることを特徴とする原核生物の遺伝子発現解析方法。

Claim 8

クレーム1に記載の原核生物の遺伝子発現解析方法であって、  
前記cDNA断片回収工程後、回収した前記cDNA断片をプラスミドベクターに連結し、組換え体プラスミドを形成する連結工程と、  
上記組換え体プラスミドを大腸菌に導入する導入工程と、  
を備えることを特徴とする原核生物の遺伝子発現解析方法。

Claim 9

クレーム 8 に記載の原核生物の遺伝子発現解析方法であって、  
前記cDNA 断片回収工程後、前記連結工程前に、回収した前記cDNA 断片について、  
前記第 1 アダプター配列に相補的な配列を有する第 3 プライマーと、前記第 2  
アダプター配列に相補的な配列を有する第 4 プライマーとを用いて、PCR 反応を  
行う第 2 PCR 工程を備えることを特徴とする原核生物の遺伝子発現解析方法。

#### ABSTRACT OF THE DISCLOSURE

原核生物の遺伝子発現解析方法は、mRNAを抽出する工程と、mRNAの3'末端にボリAを付加する工程と、mRNAからcDNAを合成する工程と、cDNAから一端に第1アダプター配列を有し他端に第2アダプター配列を有するcDNA断片を作成する工程と、第1アダプター配列に相補的な配列を有する第1プライマーと第2アダプター配列に相補的な配列を有する第2プライマーとを用いて、cDNA断片についてPCR反応を行う工程と、増幅されたcDNA断片について電気泳動を行う工程と、電気泳動の結果に基づいて、目的のcDNA断片を回収する工程と備える。